



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **107136**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/53** (2006.01)

**A61K 35/17** (2015.01)

**A61P 15/08** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 11058**

(22) Дата подання заявки: **12.11.2015**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.05.2016**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.05.2016, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):

**Драннік Георгій Миколайович (UA),  
Горпинченко Ігор Іванович (UA),  
Порошина Тетяна Вікторівна (UA),  
Нуріманов Каміль Раїсович (UA),  
Савченко Вікторія Станіславівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ  
УРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ",  
вул. Ю. Коцюбинського, 9-а, м. Київ, 04053  
(UA)**

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПОРУШЕНЬ ІМУНОЛОГІЧНОЇ СУПРЕСІЇ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ПРОСТАТИТ

(57) Реферат:

Спосіб визначення порушень імунологічної супресії у хворих на хронічний простатит полягає у визначенні супресивного ефекту секрету передміхурової залози в реакції бласттрансформації лімфоцитів крові. Додатково для визначення показника індексу супресії проводять порівняння показників проліферативної активності Т-лімфоцитів периферичної крові під впливом фітогемаглютинину та проліферативної активності Т-лімфоцитів периферичної крові під впливом фітогемаглютинину в присутності аутологічної сім'яної плазми та значення показника індексу супресії нижче за 70 % свідчить про зниження імуносупресивної властивості сім'яної плазми.

UA 107136 U



Спосіб належить до медицини, а саме до клінічної імунології, і може бути використаний для визначення порушень імунологічної супресії у хворих на хронічний простатит.

Питання щодо значення імунологічної супресії обговорюються, насамперед, в зв'язку з визначенням ролі імунологічних факторів у розвитку непліддя. Визнається, що порушення балансу протективних механізмів (гематотестикулярний бар'єр, імуносупресивні фактори сім'яної плазми і імунорегуляція супресивних механізмів у чоловіків та жінок) призводить до порушень фертильної здатності сперми і раннього ембріогенезу. Імунопривілейованість чоловічих статевих залоз є основою їх нормальної функції. Особливістю гермінативного епітелію статевих залоз є те, що він розвивається і відокремлюється в процесі ембріогенезу раніше, ніж імунна система. Тому його антигени є чужорідними для власної імунної системи. Ізолює ці антигени від імунної системи гематотестикулярний бар'єр, основою якого є щільні контакти клітин Сертолі. Крім того, клітини Сертолі експресують CD95, який викликає апоптоз лімфоцитів, котрі проникають в паренхіму яєчка. Відомо, що сім'яна плазма є сумішшю секретів передміхурової залози (30-35 %), сім'яних пухирців (50-60 %), бульбоуретральних та парауретральних залоз (1-5 %). Її імуносупресивна властивість обумовлена різноманітними її компонентами, в першу чергу, простагландинами та трансформуючим фактором росту (TGF- $\beta$ ). В забезпеченні імуносупресивного ефекту приймають участь також клітини Лейдига, які продукують тестостерон. Важливо, що імуносупресивний ефект дають і самі еякульовані сперматозоїди. Вони здатні сорбувати на собі інгібітор проліферації лімфоцитів, а можливо, й інші інгібітори з сім'яної плазми. Так, за сучасними даними, чоловічі статеві клітини різного ступеня зрілості, у тому числі й сперматозоїди еякуляту, експресують (отже, можуть і зв'язувати) функціональні рецептори до ряду цитокінів: трансформуючого фактора росту альфа/бета (TGF- $\alpha/\beta$ ), гепатоцитарного ростового фактора (HGF), інсуліноподібного ростового фактора (IGF-1R), гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора (GM-CSF), інтерлейкіну (IL)-2 (IL-2R  $\alpha$ - і  $\beta$ -), хемокінів (RANTES, CX3CR1). Встановлено також, що показники патоспермії у хворих на хронічний абактеріальний простатит кореляційно пов'язані з концентрацією TGF- $\beta$ 1 в еякуляті; а за добу в оточенні аутологічної сім'яної плазми експресія CD95-рецепторів на сперматозоїдах у хворих збільшується і кореляційно залежить від концентрації TGF- $\beta$ 1 в еякуляті. Тому визначення порушень супресивної властивості сім'яної плазми відображає порушення того балансу, що забезпечує стан імунопривілейованості сперматозоїдів в нормі.

Відомий спосіб діагностики хронічного простатиту [1], що взятий за прототип, який полягає у визначенні супресивного ефекту секрету передміхурової залози в реакції бластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ) крові.

Недоліком способу є те, що визначають імуносупресивний ефект секрету передміхурової залози (лише одного з складових компонентів сім'яної плазми). До того ж, лабораторні характеристики секрету передміхурової залози суттєво залежать від того, наскільки повним був її забір.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб визначення порушень імунологічної супресії у хворих на хронічний простатит шляхом визначення супресивної дії сім'яної плазми в тесті інгібіції проліферативної активності Т-лімфоцитів периферичної крові при порівнянні показників проліферативної активності Т-лімфоцитів периферичної крові під впливом фітогемаглютину та проліферативної активності Т-лімфоцитів периферичної крові під впливом ФГА в присутності аутологічної сім'яної плазми, що дасть змогу оцінити порушення імуносупресивної властивості сім'яної плазми за показником індексу супресії.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення порушень імунологічної супресії у хворих на хронічний простатит, що полягає у визначенні порушень імунологічного ефекту секрету передміхурової залози в реакції бласттрансформації лімфоцитів крові, згідно з корисною моделлю, додатково для визначення показника індексу супресії проводять порівняння показників проліферативної активності Т-лімфоцитів периферичної крові під впливом фітогемаглютину та проліферативної активності Т-лімфоцитів периферичної крові під впливом фітогемаглютину в присутності аутологічної сім'яної плазми та значення показника індексу супресії нижче за 70 % свідчить про зниження імуносупресивної властивості сім'яної плазми.

Спосіб визначення порушень імунологічної супресії у хворих на хронічний простатит виконують наступним чином:

В реакції бластної трансформації лімфоцитів підраховують кількість бласттрансформованих клітин. Для отримання клітин із стерильно взятої венозної гепаринізованої крові (30 од/мл гепарину) вилучають мононуклеари центрифугуванням на градієнті щільності фікол-верографіну ( $d=1,077$ ). Мононуклеарні клітини інкубують в культуральному середовищі RPMI-1640, яке містить 10 % ембріональної телячої сироватки, 40 мкг/мл гентамицину, 5·10М 2-

меркаптоетанолу та 3 % L-глутаміну. Встановлено, що найбільш оптимальною є концентрація клітин -  $2 \cdot 10^5$  кл/мл, розведення сім'яної плазми - 1:22. Суспензію клітин розподіляють на 3 проби: перша - без ФГА (контроль), друга - з ФГА, третя - з ФГА та з аутологічною сім'яною плазмою (СП) в розведенні 1:22. Всі проби витримують 72 год. в  $\text{CO}_2$  - інкубаторі при  $t$  37 °С.

5 Надалі готують препарати для світлової мікроскопії і проводять підрахунок бласттрансформованих клітин (бластів).

Сім'яну плазму отримують шляхом центрифугування еякуляту при 1500 об/хв. протягом 15 хвилин. Рівень інгібуючої активності сім'яної плазми у кожного обстеженого виражають за допомогою індексу супресії (ІС), який вираховують за формулою:

$$10 \quad \text{ІС} = \frac{\text{ФГА} - \text{ФГА СП}}{\text{ФГА}},$$

де ФГА - число бластів у культурі лімфоцитів з ФГА;

ФГА СП - число бластів у культурі лімфоцитів з ФГА + сім'яна плазма.

Практичне використання способу, що пропонується, проведено в лабораторії імунології ДУ "Інститут урології НАМН України". У дослідженні використана периферична кров та сім'яна плазма 7 здорових донорів, 20 фертильних чоловіків, хворих на хронічний абактеріальний простатит та 36 хворих на хронічний абактеріальний простатит, ускладнений екскреторно-токсичним непліддям. Тривалість захворювання становить від 3 до 7 років. Вік обстежених - 18-45 років.

20 В таблиці 1 наведені результати визначення індексу супресії (ІС) бластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ) з ФГА в присутності аутологічної сім'яної плазми у фертильних хворих на хронічний абактеріальний простатит та з екскреторно-токсичним непліддям в порівнянні зі здоровими чоловіками.

Таблиця 1

Показники індексу супресії у фертильних хворих на хронічний абактеріальний простатит та з екскреторно-токсичним непліддям

Клінічні групи обстежених	РБТЛ, %	Індекс супресії РБТЛ з ФГА в присутності сім'яної плазми, %
хронічний абактеріальний простатит, фертильні	$45,6 \pm 3,1$ $p_1 < 0,001$	$83,3 \pm 5,8$ $p_1 > 0,05$
хронічний абактеріальний простатит, інфертильні	$37,9 \pm 1,4$ $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,5$	$54,9 \pm 4,3$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$
здорові донори	$71,0 \pm 4,7$	$95,4 \pm 1,6$

$p_1$  - ступінь вірогідності різниці даних у хворих в порівнянні зі здоровими донорами ( $\chi^2$ );

$p_2$  - ступінь вірогідності різниці даних у фертильних і інфертильних хворих ( $\chi^2$ )

25 Як свідчать наведені дані, лімфоцити здорових донорів активно реагують на ФГА, і їх проліферативна активність через 72 години збільшується і складає  $71,0 \pm 4,7$  %.

30 Показник стимуляції лімфоцитів ФГА у фертильних хворих на хронічний абактеріальний простатит в порівнянні зі здоровими чоловіками був знижений ( $p < 0,001$ ). У хворих на екскреторно-токсичне непліддя показник бластної трансформації лімфоцитів з ФГА також був достовірно знижений ( $p < 0,001$ ).

Проте можна говорити лише про тенденцію до погіршення в периферичній крові показників реакції бластної трансформації лімфоцитів з ФГА у хворих з екскреторно-токсичним непліддям у порівнянні зі фертильними хворими на хронічний абактеріальний простатит ( $p > 0,5$ ).

35 Тим часом, інгібуючий вплив сім'яної плазми на проліферативну активність лімфоцитів був у всіх обстежених. Встановлено, що у здорових чоловіків аутологічна сім'яна плазма збільшує показник індексу супресії реакції бластної трансформації лімфоцитів з ФГА, наближаючи його майже до 100 % ( $p < 0,001$ ). Проте, у хворих на хронічний простатит, імуносупресивні властивості сім'яної плазми були знижені, статистично значущою різниця була в групі хворих на хронічний абактеріальний простатит з екскреторно-токсичним непліддям ( $p < 0,05$ ). Результати аналізу

40 даних абсолютної кількості та відсотка хворих за показником індексу супресії, нижчий за норму, наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Частота виявлення індексу супресії у хворих на хронічний абактеріальний простатит

Клінічні групи обстежених	Кількість хворих	Індекс супресії РБТЛ з ФГА в присутності сім'яної плазми		Статистичний показник
		> 70 % абс. кількість, %	< 70 % абс. кількість, %	
Фертильні	20	15 (86 %)	5 (14 %)	p<0,05
Інфертильні	36	15 (40 %)	21 (60 %)	p<0,05

Порівняльний аналіз даних показав, що відсоток хворих, у яких індекс супресії реакції бластної трансформації лімфоцитів крові з ФГА в присутності сім'яної плазми був нижчим, ніж 70 % (це значення проліферативної відповіді лімфоцитів на стандартний мітоген ФГА), в кожній з обстежених груп достовірно змінювався (p<0,05). Так, нижчим за 70 % супресивний ефект плазми був у 21 з 36 хворих з екскреторно-токсичним непліддям; у фертильних чоловіків, хворих на хронічний простатит, індекс супресії нижчий за 70 % був зареєстрований тільки у 5 з 20 випадків.

Наводимо приклади застосування запропонованого способу.

Приклад 1. Хв. К., тем. карта № 2456, 35 років. Діагноз хронічний абактеріальний простатит/синдром хронічного тазового болю поставлений хворому на підставі клінічної симптоматики захворювання за шкалою анкети NIN Prostatitis Symptom Store (CPSI), даних ультразвукового дослідження передміхурової залози та лабораторних досліджень. При дослідженні імуносупресивного ефекту аутологічної сім'яної плазми на проліферативну активність Т-лімфоцитів периферичної крові під впливом ФГА за запропонованим способом встановлено, що індекс супресії бластної трансформації лімфоцитів крові становив 50 %, що свідчить про зниження імуносупресивної властивості еякуляту.

Приклад 2. Хв. Н. тем. карта № 3658, 32 роки. Діагноз хронічний абактеріальний простатит, ускладнений екскреторно-токсичним непліддям. За запропонованим способом індекс супресії складає 35 %, що свідчить про виражене зниження імуносупресивної властивості еякуляту.

Таким чином, запропонований спосіб дає можливість оцінити імуносупресивний ефект сім'яної плазми, при цьому індекс супресії реакції бластної трансформації лімфоцитів крові з ФГА в присутності сім'яної плазми нижчий ніж 70 % (це значення проліферативної відповіді лімфоцитів на стандартний мітоген ФГА) свідчить про його порушення.

Джерела інформації:

1. А.с. 1429022 А1, SU, МПК<sup>4</sup> G01N 33/48. Способ диагностики хронического простатита / Г.Н. Дранник, И.Ф. Юнда, В.Я. Романив, Н.И. Бойко; КНИИУН; № 4035128/28-14; 12.03.86; Опуб. 07.10.88. Бюл. № 37. - 3 с. (прототип).

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення порушень імунологічної супресії у хворих на хронічний простатит, що полягає у визначенні супресивного ефекту секрету передміхурової залози в реакції бласттрансформації лімфоцитів крові, який **відрізняється** тим, що додатково для визначення показника індексу супресії проводять порівняння показників проліферативної активності Т-лімфоцитів периферичної крові під впливом фітогемаглютенину та проліферативної активності Т-лімфоцитів периферичної крові під впливом фітогемаглютенину в присутності аутологічної сім'яної плазми та значення показника індексу супресії нижче за 70 % свідчить про зниження імуносупресивної властивості сім'яної плазми.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601